

05-20-02

9p1743

Docket No.: DE-1290

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN THE MATTER OF:

Youngmi Kim PAK, et.al.

FILED: August 10, 2001

SERIAL NO.: 09/927,852

GROUP: 1743

FOR: INTERCALATOR SUITABLE FOR ELECTROCHEMICAL DETECTION OF DOUBLE STRAND DNAs AND A PROCESS FOR PREPARING THEREOF


LETTER FILING PRIORITY DOCUMENT(S)

Commissioner of Patents and Trademarks  
Box: PATENT APPLICATION  
Washington, D.C. 20231

S I R:

Applicant is enclosing herewith the certified copy of the priority document in connection with the above-identified application. It is respectfully requested that the certified copy of Korean Patent Application No. 2001-0008467, filed on February 20, 2001, be made of record in the file of this case. Please deduct any necessary fees in connection with this matter from Deposit Account Number 01-1944. A duplicate copy of this sheet is enclosed.

Respectfully submitted,

  
Richard B. Klar  
Registration No. 31,385

Dated: May 16, 2002

Anderson Kill & Olick P.C  
1251 AVENUE OF THE AMERICAS  
New York, NY 10020  
212-278-1000

MAILING CERTIFICATE

I hereby certify that the above-identified correspondence is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 Express Mail No. EL 763974104 US on May 16, 2002 and is addressed to the Commissioner for Patents, Box Patent Application, Washington, DC 20231.

Signed:   
Audrey de Souza

RECEIVED  
MAY 21 2002  
TC 1700



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

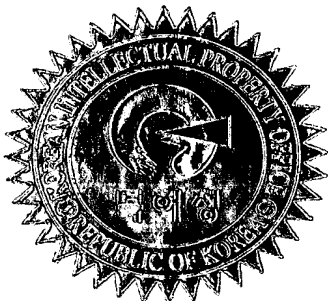
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 특허출원 2001년 제 8467 호  
Application Number PATENT-2001-0008467

출원 년 월 일 : 2001년 02월 20일  
Date of Application FEB 20, 2001

출원 인 : (주)미토콘  
Applicant(s) MITOCON LTD.

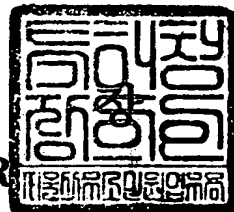
RECEIVED  
MAY 21 2002  
TC 1700



2001 년 10 월 19 일

특 허 청

COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.02.20
【발명의 명칭】	이중가닥 디엔에이의 전기화학적 검출에 유용한 인터칼레이터 화합물, 이의 제조 방법 및 이 방법에 유용한 중간체
【발명의 영문명칭】	INTERCALATOR COMPOUND USEFUL IN ELECTROCHEMICAL DETECTION OF DOUBLE STRANDED DNA, PROCESS FOR PREPARATION THEREOF AND INTERMEDIATE USED IN SAID PROCESS
【출원인】	
【명칭】	( 주)미토콘
【출원인코드】	1-2000-052008-1
【대리인】	
【성명】	위정호
【대리인코드】	9-1999-000368-8
【포괄위임등록번호】	2000-064674-7
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2000-064673-0
【발명자】	
【성명】	김영미
【출원인코드】	4-1999-054308-4
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박정호
【성명의 영문표기】	PAK, Jung Ho
【주민등록번호】	600205-1951001
【우편번호】	435-040
【주소】	경기도 군포시 산본동 삼성장미 아파트 1141-801
【국적】	KR

## 【발명자】

【성명】

김상희

【출원인코드】

4-2000-043813-6

## 【발명자】

【성명】

이홍규

【출원인코드】

4-1998-012282-7

## 【심사청구】

청구

## 【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】

2

【서열목록의 전자문서】

첨부

## 【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 위정호 (인) 대리인  
 장성구 (인)

## 【수수료】

【기본출원료】

20 면 29,000 원

【가산출원료】

1 면 1,000 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

3 항 205,000 원

【합계】

235,000 원

## 【첨부서류】

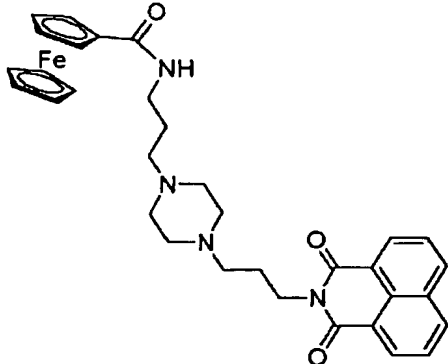
1. 요약서·명세서(도면)\_1통

## 【요약서】

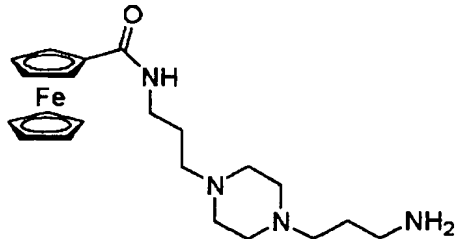
## 【요약】

본 발명은 이중가닥 DNA의 전기화학적 검출을 이용한 DNA 칩에서 인터칼레이터로 유용한, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 제조 방법 및 이 방법에서 중간체로 유용한 화학식 2의 화합물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 화학식 3의 화합물을 1-4-비스(3-아미노프로필)피페라진과 유기용매 중에서 반응시켜 화학식 2의 화합물을 얻고, 이 화합물을 염기 존재하에 유기용매 중에서 나프틸릭 안하이드라이드와 반응시켜 제조된다:

## 【화학식 1】



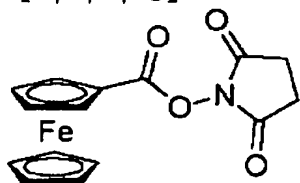
## 【화학식 2】



1020010008467

출력 일자: 2001/10/22

【화학식 3】



【대표도】

도 1

**【명세서】****【발명의 명칭】**

이중가닥 디엔에이의 전기화학적 검출에 유용한 인터칼레이터 화합물, 이의 제조 방법 및 이 방법에 유용한 중간체{INTERCALATOR COMPOUND USEFUL IN ELECTROCHEMICAL DETECTION OF DOUBLE STRANDED DNA, PROCESS FOR PREPARATION THEREOF AND INTERMEDIATE USED IN SAID PROCESS}

**【도면의 간단한 설명】**

도 1은 전극의 제조방법을 도식적으로 나타낸 것이고,

도 2는 본 발명에 따른 화학식 1의 인터칼레이터 화합물과 화학식 4의 인터칼레이터 화합물을 이용한 순환전류전압곡선 측정의 원리를 도식적으로 나타낸 것이고,

도 3은 본 발명에 따른 화학식 1의 인터칼레이터 화합물과 화학식 4의 인터칼레이터 화합물의 혼합물을 사용한 경우의 검출 감도 증가 효과를 나타낸 그래프이다.

## 【발명의 상세한 설명】

## 【발명의 목적】

## 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <4> 본 발명은 이중가닥 DNA의 전기화학적 검출에서 유용한 인터칼레이터 화합물, 이의 제조 방법 및 이 방법에 유용한 중간체에 관한 것이다.
- <5> 인간 게놈 프로젝트가 진행됨에 따라 기존의 분자생물학적 연구방법들을 대체할 수단으로 DNA-칩 기술이 크게 주목받고 있다. DNA-칩은 적게는 수십에서 수백만 종류의 DNA 조각을 슬라이드 글라스와 같은 아주 작은 표면에 집적한 것으로 이를 이용한 DNA 검출 방법은 적은 양의 시료에 들어 있는 RNA 또는 DNA를 짧은 시간에 검출할 수 있으므로 기존의 서던 블롯(Southern blot)이나 노던 블롯(Northern blot)을 대량으로 짧은 시간에 수행할 수 있다는 점에서 매우 각광받고 있다. DNA 칩은 유전체 연구 및 분자생물학적 연구에 필수적인 대량의 RNA 발현측정, 게놈 DNA의 돌연변이 검출, 유전자 진단, 약물유전학(pharmacogenomics), 맞춤의약 등에 응용할 수 있다.
- <6> 현재까지 크게 올리고칩(oligochip)과 cDNA 칩이라는 두 가지 종류의 DNA 칩이 소개되고 있는데, 전자는 20-25머(mer)의 올리고뉴클레오타이드를 수십만개 집적한 것이고, 후자는 올리고뉴클레오타이드보다 좀 더 긴 cDNA 조각을 집적한 것이다.
- <7> 기존에 알려진 DNA-칩의 기본 원리는 특정 염기서열을 가진 프로브 DNA 조각을 칩으로 불리는 표면에 다양한 방법으로 집적한 후, 집적된 프로브 DNA 조각



중 어떤 프로브 DNA가 시료에 존재하는 표적(target) DNA(또는 RNA)와 결합하는지를 다량으로 검출하는 것이다.

<8> 시료 중의 표적 DNA와 DNA 칩내에 집적된 프로브 DNA 조각의 결합 여부는 일반적으로 형광 물질로 표지한 시료 DNA(또는 RNA)를 DNA 칩과 하이브리드화한 후, 레이저 광을 조사했을 때 발광하는 파장과 강도로 판정하게 된다. 그러나, 이 형광 검출방법은 고가의 레이저 스캐너를 사용해야 하며, 또한 Cy3, Cy5와 같은 형광 물질로 시료 DNA (또는 RNA)를 표지할 때 고비용이 소요되는 단점이 있다. 더구나, 형광세기와 하이브리드화된 시료 DNA의 정량적 검출이 어려워서 정량적 목적보다는 정성적 목적으로 사용되고 있다.

<9> 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로, 최근 클리니칼 마이크로센서스사(Clinical Microsensors Inc., 미국)에서는 전이금속 착물과 같은 산화환원 활성물질을 프로브 DNA의 특정 위치에 선택적으로 공유결합시킨 후 표적 DNA가 프로브 DNA에 하이브리드화하는 경우에 나타나는 전자전달 속도의 변화를 이용하여 결합여부를 확인하는 기술을 개발하였다. 또한, 일본 공개특허공보 제 2000-125865호에는 각각 외부에 출력하는 단자를 구비한 둘 이상의 전극표면에 서로 다른 염기서열 부위를 갖는 프로브 DNA가 고정된 DNA 센서위에서, 상기 프로브 DNA와 단일가닥으로 해리된 시료 DNA를 전기화학활성 인터칼레이터(intercalator) 존재하에 결합시키고 상기 프로브 DNA와 상기 시료 DNA에 의해 형성된 이중가닥 DNA에 삽입된 상기 인터칼레이터에 흐르는 전류를 측정함으로써 상기 시료 DNA의 유전자를 검출하는 방법이 기재되어 있다. 또한 인터칼레이터 화합물로서

*N,N*-비스[[4-(3-페로센카르복사아미노프로필)피페라지닐]프로필]나프탈렌

-1,4,5,8-테트라카르복실산이 개시되어 있다. 그러나, 이러한 전기화학적 방법으로 정성 및 정량적 DNA 검출을 하기 위해서는 매우 적은 양의 전류로서도 정확한 검출이 이루어질 수 있도록 검출 민감도를 증가시켜야 하며, 이를 위해 검출 강도를 더욱 증가시킬 수 있는 인터칼레이터가 요구되고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<10> 따라서, 본 발명의 목적은 이중가닥 DNA를 고감도로 검출하는 신규 인터칼레이터 화합물을 제공하는 데 있다.

<11> 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

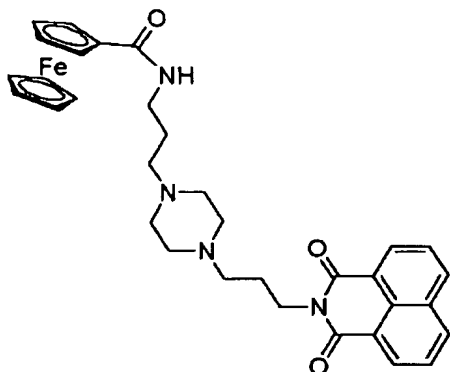
<12> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 유용한 중간체 화합물을 제공하는 데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

<13> 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 하기 화학식 1로 표시되는 인터칼레이터 화합물을 제공한다:

<14> 화학식 1

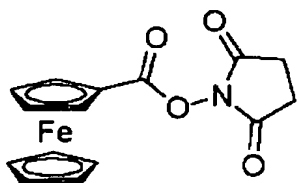
&lt;15&gt;



<16> 상기 다른 목적에 따라, 본 발명에서는 화학식 3의 화합물을 1,4-비스(3-아미노프로필)피페라진과 유기용매 중에서 반응시켜 화학식 2의 화합물을 얻고, 이를 1,8-나프탈릭 안하이드라이드(naphthalic anhydride)와 염기 존재하에 유기용매 중에서 반응시키는 단계를 포함하는 상기 화합물의 제조 방법을 제공한다:

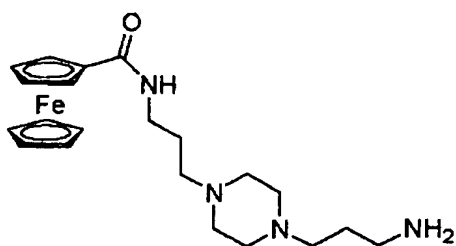
<17> 화학식 3

&lt;18&gt;



<19> 화학식 2

&lt;20&gt;

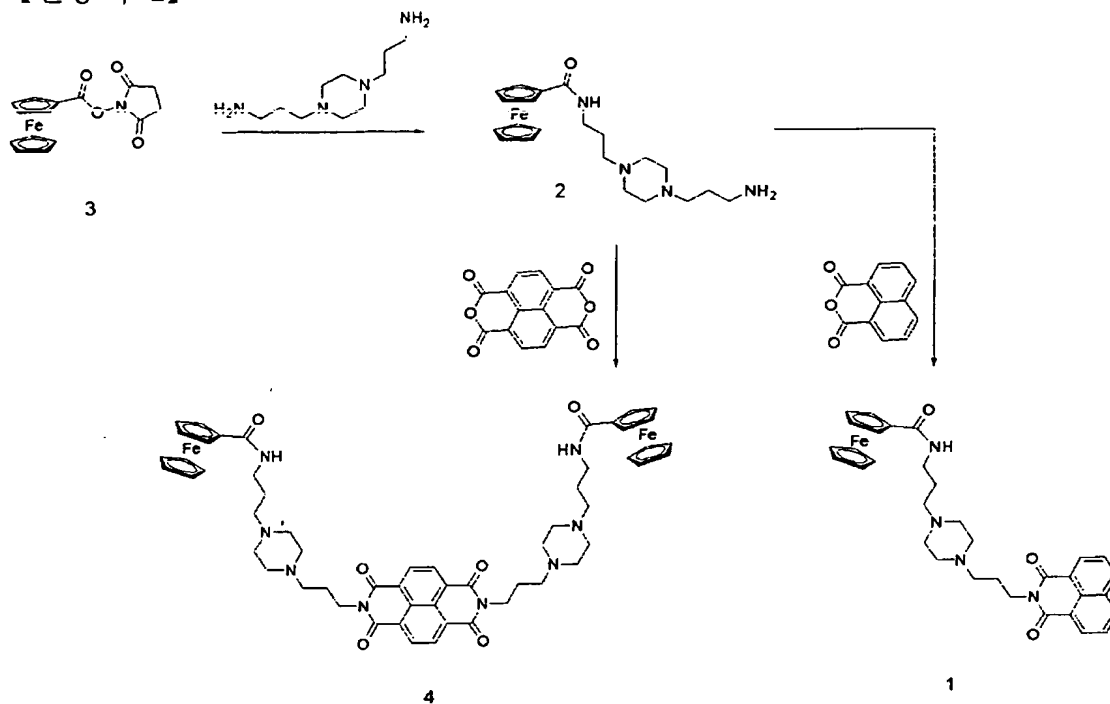


<21> 상기 또 다른 목적에 따라, 본 발명에서는 상기 방법에서 중간체로 유용한, 상기 화학식 2의 화합물을 제공한다.

<22> 이하 본 발명의 상세히 설명한다.

<23> 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물(*N*[[4-(3-페로센카복사미도프로필)피페라지닐]-프로필]-1,8-나프탈렌 이미드)은 하기 반응식에 따라 제조할 수 있다:

<24> 【반응식 1】



<25> 본 발명의 화합물의 제조에 출발물질로 사용되는 화학식 3의 화합물(페로센 카복실산의 *N*-하이드록시숙신이미드 에스테르)는 문헌(*Anal. Biochem.*, 218, 436 (1994))의 방법에 따라 제조할 수 있다. 이 화학식 3의 화합물을 1,4-비스(3-아미노프로필)피페라진과 유기용매 중에서 반응시켜 화학식 2의 화합물(*N*-[3-[4-(3-아미노-프로필)-피페라진-1-일]-프로필]-페로센아미드)을 얻을 수 있다. 이 때 유기용매로는 디클로로메탄, 클로로포름 등이 바람직하고, 반응은 0 내지 40 °C, 바람직하게는 20 내지 25 °C에서 5 내지 12 시간, 바람직하게는 8

내지 10 시간 동안 진행시킨다. 이어서 화학식 2의 화합물을 염기 존재하에 유기용매 중에서 1,8-나프탈릭 안하이드라이드(naphthalic anhydride)와 반응시켜 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물을 얻을 수 있다. 이 때 염기로는 디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민 등을 사용할 수 있고, 이 중 디이소프로필에틸아민이 바람직하다. 또한 유기용매로는 이소프로필 알콜, 벤젠, 톨루엔 등을 사용할 수 있으며 이 중 이소프로필 알콜이 바람직하며, 반응은 50 내지 110 °C, 바람직하게는 80 내지 85 °C에서 4 내지 7 시간 동안 진행시킨다.

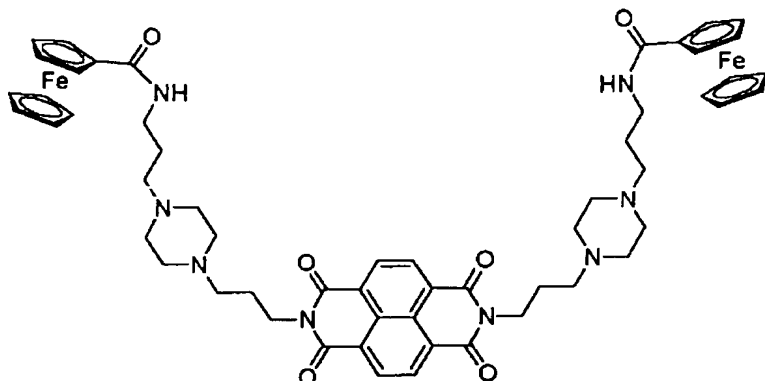
<26>       이렇게 얻어진 본 발명의 화합물은 이중가닥 DNA의 염기쌍 사이에 선택적으로 끼어드는 인터칼레이터로 작용함과 동시에 산화환원 활성을 갖는 페로센 부분을 포함하고 있어 전류를 전달하는 전기화학적 성질을 갖는다. 따라서 이 화합물은 이중가닥 DNA를 전기화학적으로 검출하는 방법에서 인터칼레이터로 사용될 수 있는데, 예를 들어, 외부로 출력하는 단자를 가진 전극에 단일가닥의 프로브 DNA를 고정시킨 DNA 검출용 키트에 이 화합물을 인터칼레이터로 사용할 경우, 시료를 키트에 가해 시료 중의 표적 DNA가 키트의 프로브 DNA와 하이브리드되어 형성된 이중결합 DNA에 본 발명의 화합물이 삽입된 구조를 가지며 여기에 전위를 걸어주어 이 화합물의 산화환원반응을 통한 전류량을 측정함으로써 시료 중의 표적 DNA를 고감도로 검출할 수 있다.

<27>       특히 본 발명의 화합물은 DNA 염기쌍 당 1 개 정도의 비율로 삽입될 것으로 예상되며 DNA의 3 내지 5 개 염기쌍 당 1 개씩의 비율로 삽입되는 인터칼레이터, 예를 들어 하기 화학식 4로 표시되는 인터칼레이터 화합물(

*N,N*-비스[[4-(3-페로센카르복사아미노프로필)피페라지닐]프로필]나프탈렌

-1,4,5,8-테트라카르복실산)과 함께 사용될 경우 표적 DNA에 대한 검출 강도를 더욱 증가시킬 수 있다:

<28> 【화학식 4】



<29> 또한, 화학식 1의 화합물의 제조 방법에서 중간체로 사용되는 화학식 2의 화합물은 신규 화합물로, 화학식 4의 화합물의 제조에서도 중간체로 사용될 수 있는데, 특히 화학식 2의 화합물을 염기 존재하에 유기용매 중에서 1,4,5,8-나프탈렌테트라카르복실산 디안하이드라이드(naphthalenetetracarboxylic dianhydride)와 반응시킬 경우 화학식 4의 화합물을 고수율로 얻을 수 있다.

<30> 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<31> 제조예 1: 페로센카르복실산의 *N*-하이드록시숙신이미드 에스테르의 합성

<32> 문헌(

*Anal. Biochem.*, 218, 436 (1994))의 방법에 따라, 증류된 1,4-디옥산 40 ml에 페로센카복실산 1,000 mg(4.35 mmol)과 *N*-하이드록시숙신이미드 560 mg(4.87 mmol)을 교반하여 녹인 용액에, 디시클로헥실카보디이미드 (dicyclohexylcarbodiimide) 100 mg(4.86 mmol)을 증류된 1,4-디옥산 10 ml에 녹인 용액을 가하였다. 이 혼합물을 질소분위기하에 실온에서 12 시간 동안 교반한 후 여과하여 침전물을 제거하였다. 여액을 농축한 후 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(헥산:에틸 아세테이트=1:1,  $R_f=0.40$ )를 실시하여 황백색 고체의 표제 화합물 1.39 g을 얻었다(99%).

<33>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ; 300MHz)  $\delta$  2.88 (4H, br s), 4.39 (5H, s), 4.57 (2H, m), 4.95 (2H, m) ppm

<34> 실시예: *N*-[[4-(3-페로센카복스아미도프로필)피페라지닐]-프로필]-1,8-나프탈렌 이미드의 제조

<35> (단계 1) *N*-[3-[4-(3-아미노-프로필)-피페라진-1-일]-프로필]-페로센아미드의 제조

<36> 1,4-비스(3-아미노프로필)피페라진 284  $\mu\text{l}$ (1.376 mmol)를 디클로로메탄 14 ml에 녹인 용액을, 제조예 1에서 얻은 화합물 300 mg(0.917 mmol)을 디클로로메탄 10 ml에 녹인 용액에 주사기 펌프를 이용하여 10 시간 동안 서서히 적가하였다. 이어서 반응물을 여과하여 침전물을 제거하고 여액을 농축한 후 실리카겔

크로마토그래피(메탄올:수산화암모늄=9:1,  $R_f=0.23$ )를 실시하여 황색 고체의 표제 화합물 255 mg을 얻었다(62%).

<37>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ; 300MHz)  $\delta$  1.65 - 1.86 (4H, m), 2.35 - 2.80 (14H, m), 2.97 (1H, m), 3.45 (2H, m), 4.20 (5H, s), 4.33 (2H, br s), 4.69 (2H, br s), 6.91 (1H, br m) ppm

<38> (단계 2) *N*-[[4-(3-페로센카복스아미도프로필)피페라지닐]-프로필]-1,8-나프탈렌 이미드(IC2)의 제조

<39> 단계 1에서 얻은 화합물 41.2 mg(0.10 mmol)과 디소프로필에틸아민 26  $\mu\text{l}$  (0.150 mmol)을 이소프로필 알콜 10 ml에 녹인 용액에 1,8-나프탈릭 안하이드라이드 17.8 mg(0.09 mmol)을 가하였다. 이 혼합물을 질소 분위기하에서 2 시간 동안 환류 가열하였다. 이 반응액을 실온까지 냉각시킨 후 여과하여 갈색 침전물을 얻고 차가운 이소프로필 알콜 2 ml로 3 회 세척하였다. 얻어진 고체를 프로톤 핵자기공명(NMR) 및 가스 크로마토그래피(GC) 분석한 결과 98 % 이상의 순도를 가지는 것으로 확인되었으며, 아세톤으로 재결정하여 더욱 정제된 황색 고체의 표제 화합물 49 mg(0.083 mmol)을 얻었다(83%).

<40>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ; 300MHz)  $\delta$  1.71 (2H, m), 1.94 (2H, m), 2.43 (6H, m), 2.53 (6H, m), 3.41 (2H, q,  $J = 6.0$  Hz), 4.15 (5H, s), 4.22 (4H, br m), 4.68 (2H, br s), 7.21 (1H, br m) 7.73 (2H, dd,  $J = 7.5, 8.1$  Hz), 8.19 (2H, d,  $J = 8.1$  Hz), 8.57 (2H, d,  $J = 7.5$  Hz) ppm



<41> 제조예 2: *N,N*-비스[[4-(3-페로센카복스아미노프로필)피페라지닐]프로필]나프탈렌-1,4,5,8-테트라카복실산(IC1)의 제조

<42> 실시예의 단계 1에서 얻은 화합물 110 mg(0.267 mmol)과 디이소프로필에틸아민 56  $\mu$ l(0.320 mmol)을 이소프로필 알콜 12 ml에 녹인 용액에 1,4,5,8-나프탈렌테트라카복실 디안하이드라이드 28.6 mg(0.107 mmol)을 가하였다. 이 혼합물을 질소 분위기하에서 6 시간 동안 환류 가열하였다. 이 반응액을 실온까지 냉각시킨 후 여과하여 갈색 침전물을 얻고 차가운 이소프로필 알콜 2 ml로 3 회 세척하였다. 얻어진 고체를 프로톤 NMR 및 GC 분석한 결과 98 % 이상의 순도를 가지는 것으로 확인되었으며, 아세톤으로 재결정하여 더욱 정제된 황색 고체의 표제 화합물 110 mg(0.104 mmol)을 얻었다(97%).

<43>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.72 (4H, m), 1.96 (4H, m), 2.43 (12H, m), 2.57 (12H, m), 3.44 (4H, m), 4.30 (10H, m), 4.32 (8H, br s), 4.69 (4H, br s), 7.02 (2H, m), 8.78 (4H, s) ppm

<44> 시험예: DNA 검출 시험

<45> (단계 1) 프로브 DNA가 고정된 전극의 제조

<46> 먼저, 전극을 제작하기 위해, 순금(Au) 전극(면적 2 mm<sup>2</sup>, MF-2014 AUE gold electrode, BAS, IN, USA)을 끓인 2 M NaOH 용액에 5분, 진한 질산에 5분간 세척한 후, 증류수에서 3분간 2회 초음파처리하였다. 각 단계마다 증류수로 세척하였다. 전극을 0.1 M 황산 수용액에 담그고, 볼타메트릭 애널라이저

(voltammetric analyzer(BAS, CV-50W, IN. USA))를 이용하여 0 V부터 1.5 V까지 (vs. Ag/AgCl) 100 mV/s의 속도로 사이클(cycle)을 돌려 이 물질에 의한 전류량이 검출되지 않을 때까지(20회 정도) 기준선(basal line)을 잡았다. 이렇게 얻어진 나전극(bare electrode)을 1 mM 2-머캅토에탄올(2-ME) 용액에 2 시간 동안 처리하여 2-ME의 -SH와 Au 전극 표면이 반응하도록 하였다. 얻어진 순금 전극은 표면에 2-ME 단층이 코팅된 상태이고 그 반대쪽은 -OH기가 노출되게 된다.

<47> 이 2ME-순금 전극에 프로브 DNA를 고정시키기 위해, 임의의 센스 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로서 서열번호: 1 및 2의 올리고뉴클레오티드들을 제조한 후 센스 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 인산기를 결합시켰다.

<48> 40 mM 2-[N-모르폴리노]에탄설폰산(MES) 완충액(pH 4.5)에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDAC) 및 센스 올리고뉴클레오티드(ssDNA)를 각각 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  및 1 mM의 최종농도로 녹인 용액을 2-ME-순금 전극 표면에 24 시간 동안 처리하여 단일가닥 DNA의 인산기와 2-ME의 -OH가 결합하도록 고정화하였다. 단일가닥 DNA가 고정된 2-ME-순금 전극의 제조 과정은 도 1에 나타내었다.

<49> (단계 2) 단일가닥 DNA가 고정된 2-ME-순금 전극을 이용한 DNA 검출

<50> 서열번호: 2의 안티센스 DNA(asDNA) 시료 1  $\mu\text{l}$  (1 nmol/ $\mu\text{l}$ )를 30 $\mu\text{l}$ 의 하이브리드화 용액(0.09  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  연어 정자 DNA, 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  아세틸화된 우 혈청 알부민, 27 mM MES(free acid), 74 mM MES(sodium salt), 0.89 M NaCl, 0.01 %

tween 20, 20 mM EDTA, 최종농도)에 가한 후, 이 용액에 단계 1에서 제작된 단일 가닥 DNA가 고정된 2-ME-순금 전극을 담그고 37 °C에서 24 시간 동안 반응시켜 하이브리드 DNA를 형성하게 하였다. 이를 세척 용액(27 mM MES(free acid), 74 mM MES(sodium salt), 26 mM NaCl, 0.01 % 트윈 20, 최종농도)으로 37°C에서 15 분간씩 3회 세척하여 이중가닥 DNA(dsDNA)가 결합된 전극을 얻었다(dsDNA-전극). 전극의 제조과정은 도 1에 나타내었다.

<51> 이 dsDNA-전극을 제조에 2와 실시예에서 얻은 화합물(IC1)과 (IC2)가 인터칼레이터로서 40  $\mu$ M 농도로 포함된 수용액으로 10분간 상온에서 처리하여 인터칼레이터들이 dsDNA에 삽입되도록 하였다.

<52> 비교를 위해, 다른 dsDNA-전극에 IC1만을 동일한 방법으로 처리하였다.

<53> 각 dsDNA-전극을 작업전극(working electrode)으로, Ag/AgCl을 기준전극(reference electrode)으로, Pt 선(wire)를 상대전극(counter electrode)으로 한 삼전극계를 이용하여 각 전극에 흐르는 전류를 볼타메트릭 애널라이저(voltammetric analyzer(BAS, CV-50W, UK))로 측정하여 순환전류전압곡선(CV)으로 나타내었다. 전해질 용액으로 0.1 M KCl이 포함된 0.1 M 아세트산/아세트산 칼륨 완충액(pH 5.6)을 이용하였다. 전해질 용액 중에 산화환원 반응과정에서 발생하는 전류의 양이 IC1 및 IC2를 경유하여 전극으로 전달되고 이 양이 CV를 통해 측정되는 것이다. 이러한 원리는 도 2에 도식적으로 나타내었다.

<54> 그 결과는 도 3에 나타내었으며, 여기에서 B는 ME-전극이고 S는 ssDNA-전극이며 D는 dsDNA 전극이다. 도 3에 보듯이, IC1을 단독으로 사용할 때보다 IC1과 IC2를 1:1로 섞어서 사용하였을 때 산화전류량이 약 2배 증가하였다. 이는 IC1

이 결합하지 못한 자리에 작은 크기의 IC2가 들어가서 전극표면으로의 전자전달을 더 용이하게 해주었기 때문으로 해석된다. 또한 IC2는 산화된 상태의 IC1을 환원시키는 슈퍼센시타이저(supersensitizer)의 역할을 한다고도 볼 수 있다. 따라서 IC2를 IC1과 함께 사용하면, 전극의 민감도를 2배 이상 증가시킬 수 있다.

#### 【발명의 효과】

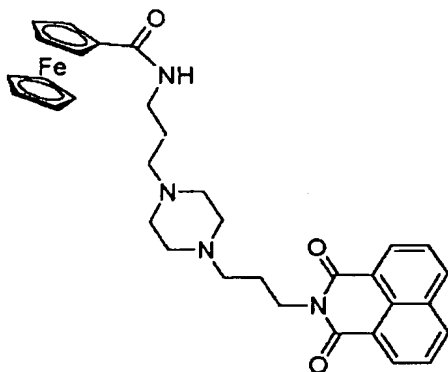
<55> 본 발명의 화합물은 이중가닥 DNA의 전기화학적 검출에 있어 인터칼레이터로 유용하며, 특히 화학식 4의 화합물과 함께 사용될 경우 검출 감도가 높다.

## 【특허청구범위】

## 【청구항 1】

하기 화학식 1로 표시되는 인터칼레이터 화합물:

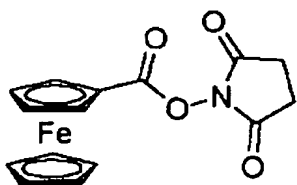
화학식 1



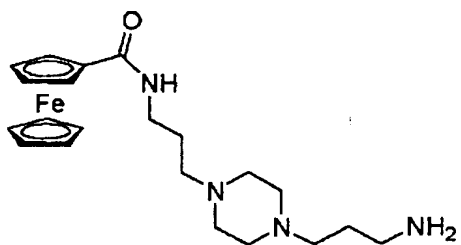
## 【청구항 2】

화학식 3의 화합물을 1,4-비스(3-아미노프로필)피페라진과 유기용매 중에서 반응시켜 화학식 2의 화합물을 얻고, 화학식 2의 화합물을 1,8-나프탈릭 안하이드라이드와 염기 존재하에 유기용매 중에서 반응시키는 단계를 포함하는, 제 1 항에 따른 화합물의 제조 방법:

화학식 3

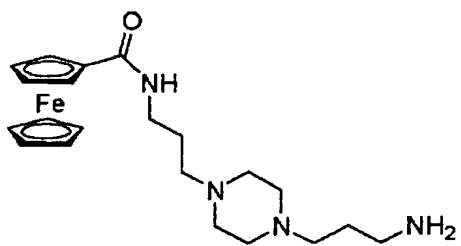


화학식 2

**【청구항 3】**

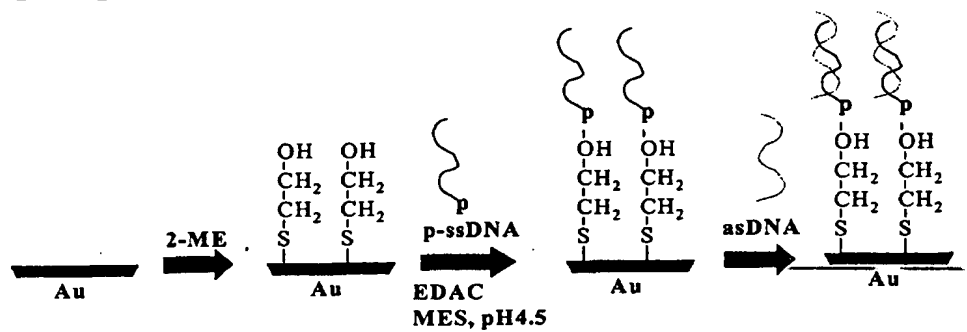
하기 화학식 2로 표시되는 화합물:

화학식 2



【도면】

【도 1】



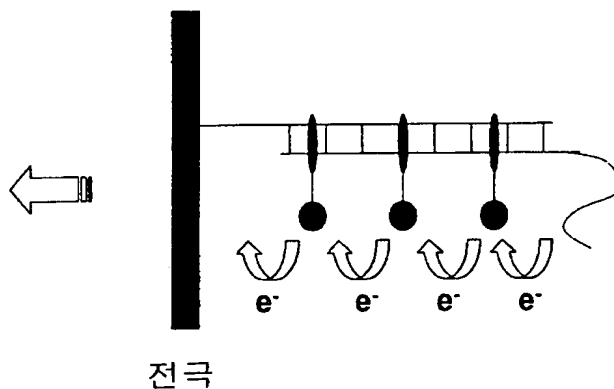
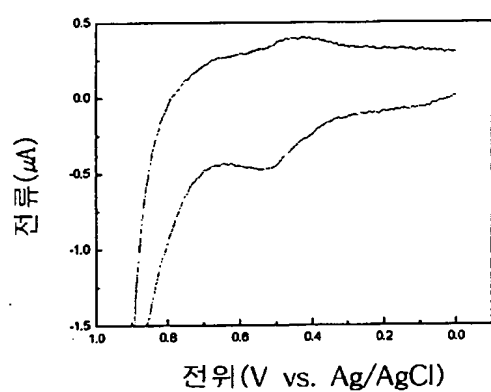
나전극

ME-전극

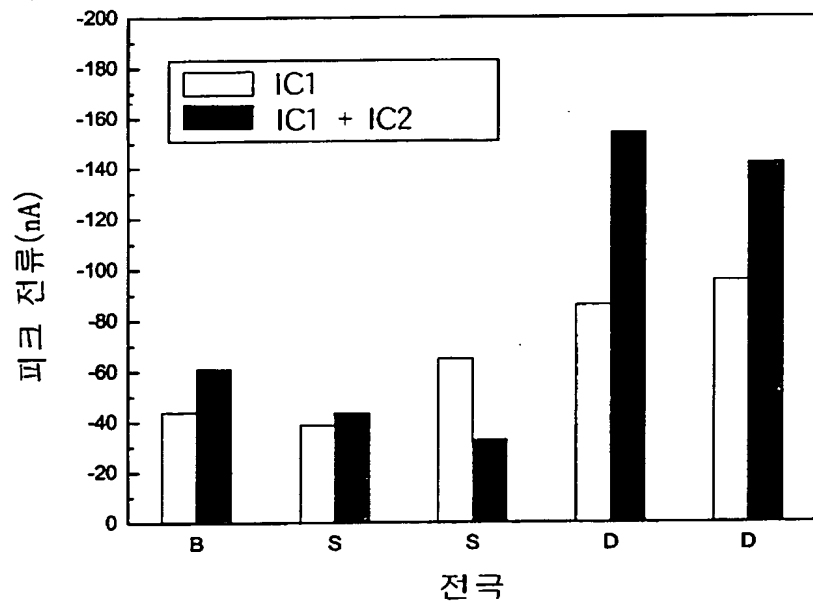
ssDNA-전극

dsDNA-전극

【도 2】



【도 3】



## 【서열목록】

<110> MITOCON LTD. <120> INTERCALATOR COMPOUND USEFUL IN  
ELECTROCHEMICAL DETECTION OF DOUBLE STRANDED DNA, PROCESS FOR  
PREPARATION THEREOF AND INTERMEDIATE USED IN SAID PROCESS

<130> 2000-837 <160> 2 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1 <211> 28 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> synthetic sense

oligonucleotide <400> 1 cctaaccaga ttccaattt tatctttt

28 <210> 2 <211> 28 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> antisense of SEQ ID NO: 1

<400> 2 aaaagataaa atttgaaatc tggtagg

28



## 【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.07.20
【출원인】	
【명칭】	( 주 )미토콘
【출원인코드】	1-2000-052008-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	위정호
【대리인코드】	9-1999-000368-8
【포괄위임등록번호】	2000-064674-7
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2000-064673-0
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2001-0008467
【출원일자】	2001.02.20
【심사청구일자】	2001.02.20
【발명의 명칭】	이중가닥 디엔에이의 전기화학적 검출에 유용한 인 터칼레이터 화합물, 이의 제조 방법 및 이 방법에 유용한 중간체
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-01-0036818-34
【접수일자】	2001.02.20
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	발명자
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【발명자】	
【성명】	김영미
【출원인코드】	4-1999-054308-4

## 【발명자】

【성명의 국문표기】

박정호

【성명의 영문표기】

PAK, James Jungho

【주소】

경기도 군포시 산본동 삼성장미 아파트  
1141-801

【국적】

US

## 【발명자】

【성명】

김상희

【출원인코드】

4-2000-043813-6

## 【발명자】

【성명】

이홍규

【출원인코드】

4-1998-012282-7

## 【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조  
의 규정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인  
위정호 (인) 대리인  
장성구 (인)

## 【수수료】

【보정료】

0 원

【기타 수수료】

원

【합계】

0 원